

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 01080294
PUBLICATION DATE : 27-03-89

APPLICATION DATE : 21-09-87
APPLICATION NUMBER : 62238394

APPLICANT : MARUBENI CORP;

INVENTOR : HIMENO MICHIO;

INT.CL. : C12N 15/00 A01N 63/00 C07K 13/00 C12N 1/20 C12P 21/02 //C12P 21/02 , C12R 1:19)

TITLE : BT INSECTICIDAL PROTEIN GENE

ABSTRACT : PURPOSE: To mass-produce an insecticidal protein, produced by *Bacillus.thuringiensis.israeliensis* strain and capable of exhibiting high insecticidal activity against larvae of striped mosquito, by elucidating gene of the insecticidal protein and using a genetic recombination technique.

CONSTITUTION: A genetic library is prepared from a plasmid DNA of *Bacillus.thuringiensis.israeliensis* and screened by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method using anti-*israeliensis* insecticidal protein IgG. Thereby a plasmid containing the aimed insecticidal protein gene is isolated.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭64-80294

⑬ Int. Cl. 4

C 12 N 15/00
A 01 N 63/00
C 07 K 13/00
C 12 N 1/20
C 12 P 21/02
//(C 12 P 21/02
C 12 R 11:19)

識別記号

序内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月27日

A-8412-4B
F-7057-4H
8318-4H
G-8515-4B
C-6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 6 (全8頁)

⑮ 発明の名称 B T殺虫蛋白遺伝子

⑯ 特願 昭62-238394

⑰ 出願 昭62(1987)9月21日

⑱ 発明者 駒野 蔵

京都府京都市西京区大枝南福西町2丁目15-14

⑲ 発明者 姫野 道夫

東京都中野区上高田5丁目5番2-501号

⑳ 出願人 住友化学工業株式会社

大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地

㉑ 出願人 丸紅株式会社

大阪府大阪市東区本町3丁目3番地

㉒ 代理人 弁理士 諸石 光潔

外1名

明細書

(6) 第2図に記載のアミノ酸配列を有する殺虫蛋白

1. 発明の名称

B T殺虫蛋白遺伝子

2. 特許請求の範囲

(1) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子並びにこれを含むDNA配列

(2) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含む組換えプラスミド

(3) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含む組換えプラスミドを含む微生物

(4) pBGH3, 若しくはpUCH3と命名した発現プラスミドを保持する特許請求の範囲第3項記載の微生物

(5) 大腸菌JM109/pUCH3或いはHB101/pBGH3である特許請求の範囲第3項記載の微生物

(7) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含み、これを微生物で発現させる発現プラスミド

(8) pBGH3, 及びpUCH3と命名した特許請求の範囲第7項記載の発現プラスミド

(9) 第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白遺伝子を含む発現プラスミドにより形質転換され該殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法

(10) 遺伝子が第2図に記載の塩基配列で特定されることを特徴とする特許請求の範囲第9項記載の製造方法

(11) pBGH3, 若しくはpUCH3と命名した発現プラスミドを保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第9項記載の製造方法

3. 発明の詳細な説明

特開昭64-80294 (2)

産業上の利用分野

本発明は、ヤブカに代表される双翅目の幼虫に対して高い殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白、該殺虫蛋白の遺伝子、該遺伝子を含みこれを大腸菌及び枯草菌等で発現させる発現プラスマド、該プラスマドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

従来の技術

バチラス・チュリンゲンシスの各種菌株は胞子形成期に殺虫蛋白からなる1~2μmにおよぶ結晶を形成し、この結晶蛋白を摂食した昆虫は、摂食活動を停止し、腸管破裂等を起こしたのち、死に至ることが知られており、ある種の菌株の製剤は殺虫剤として使用されている。

バチラス・チューリンゲンシス株は、鞭毛抗原やエステラーゼ活性などにより29亜種に分類されており、各々の菌株は特異的、かつそれぞれ、異なる

殺虫活性を示す。バチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白はこの菌株のプラスミド上の遺伝子にコードされていることが、Sekar ら(Gene, 33 (1985) p151-158), Waaijwijk ら(Nucleic Acids Research 13 (1985) p8207-8217), Ward ら(Journal of Molecular Biology, 191, (1986) p1-11), Bourguoin ら(Molecular General Genetics, 205, (1986) p390-397) および Umemoto ら(Agricultural and Biological Chemistry, 49 (1985), p573-580)などにより示されている。

またバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白の性質はThomasら(*Journal of Cell Science*, 60, (1983) p181-197)及びTyrellら(*Journal of Bacteriology*, 145, (1981), p1052-1062)に記載されている。

問題解決の手段

本発明者らはヤブカの幼虫に対し高い殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の生産する新規な殺虫蛋白をコードする遺伝子を当該菌株の巨大プラスミドからクローン

とにより単離することができる。或いは、第2回記載の塩基配列より合成したスクレオチドをプローブとして用い、常法によりスクリーニングすることにより単離することができる。

よく知られているように多くのアミノ酸についてはそれをコードする DNA塩基配列は複数存在する。従って、その塩基配列は一義的に決まらず多數の可能性が在りうる。本発明者らにより明らかにされたバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株の殺虫蛋白のアミノ酸配列をコードする遺伝子の場合も、その DNA の塩基配列は、天然の遺伝子の塩基配列以外にも多數の可能性があるが、本発明の遺伝子は、天然の DNA 塩基配列のみに限定されるものではなく、本発明により明らかにされた殺虫蛋白のアミノ酸配列をコードする他の DNA 塩基配列を含むものである。

また、遺伝子組換え技術によれば基本となる DNA の特定の部位に、該 DNA がコードするものの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するように、人为的に変異を起こす。

特開昭64-80294 (3)

とができる。 本発明により提供される、天然の
塩基配列を有する遺伝子あるいは天然のものとは
異なる塩基配列を有する遺伝子に關しても、同様
に人为的に挿入、欠失、置換を行うことにより天
然の遺伝子と同等あるいは改善された特性とする
ことが可能であり、本発明はそのような変異遺伝
子を含むものである。

本発明のバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシスの殺虫蛋白遺伝子を適當なベクター、
エレンシスの殺虫蛋白遺伝子を適當なベクター、
例えば lac プロモーターを保持する発現ベクター、
pUC18やpUC19 (ファルマシア社), 大腸菌の強力
プロモーターである lac プロモーターと rrnBリボ
ソーム RNAのターミネーターをもつ発現ベクター
pKK223-3(ファルマシア社), ltp プロモーターを
保持する発現ベクター pDR720(ファルマシア社),
挿導可能な発現ベクター pPL-Lambda(ファルマシア社),
枯草菌用ベクター pC194, pVB110などに接
続することにより大腸菌や枯草菌等の微生物でバ
チラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス株
の殺虫蛋白を生産させる発現ベクターを構築する

蛋白吸いは固体処理物は殺虫剤として有用である。以下に実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明する。本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではなく、本発明の技術分野に於ける通常の変更をすることができる。

实施例

1. バチラス・チュリンゲンシス・イスラエレン シスの殺虫蛋白遺伝子のクローニング

ステップ1 プラスミドDNAの調製

パチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス HDS22株 (アメリカ農務省(USDA)寄託菌株 Goldberg ONR60) を 100mg の PY の培地 (トリプトン (シグマ社) 10g, NaCl (半井化学) 5g, イーストエキストラクト (シグマ社) 5g を加え蒸留水で 12 とし、pH7.0 に調整した培地) 中で 30°C 1 晚 培養し、3,500 rpm 15 分間の遠心で集菌後、 Birnboim らの方法 [Nucleic Acids Res. 7:1513-1523 (1979)] に従い、プラスミド DNA を調製し CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。 さらに、調製したプラスミド DNA を 5~25% の庶

ことができる。 本発明の殺虫蛋白遺伝子を保持する発現ベクターを大腸菌 JM109株 (ファルマシア社)、や枯草菌等の宿主微生物に導入することにより殺虫蛋白を生産する微生物を得ることができる。

この様にして製造された形質転換微生物を適当な条件下(例えば、培地 : 1L の蒸留水に対して 10g のトリプトン、5g の NaCl、5g のイーストエキストラクト、1g グルコース (pH7.2)、培養温度 : 37°C、培養時間 : 8-24 時間、培養条件 : 振とう培養) で培養することにより該段虫蛋白を大量生産することが可能である。 培養後の段虫蛋白の単離は、例えば、固体を超音波で破碎し、遠心分離することにより、段虫蛋白からなる凝集体を容易に濃縮、回収する操作により行うことができる。 また、大腸菌や枯草菌の宿主-ベクター系のみならず、酵母、ショウドモナス菌あるいは放線菌の宿主-ベクター系も利用可能であり、それぞれの宿主-ベクター系の特徴を生かした段虫蛋白の大規模生産が行える。 このようにして得られた段虫

糖濃度勾配中に31,000 rpmで2.5時間遠心することによりサイズ分画を行い、巨大プラスミド画分を分取した。0.5%アガロース電気泳動の結果、この画分に含まれるプラスミドの分子量は少なくとも63 MD 以上であった。

ステップ2 遺伝子バンクの作製

調製した巨大プラスミドDNA約1 μ gに10ユニットの制限酵素HindIII(宝酒造)を加え、20 μ lのHindIII反応液(10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM $MgCl_2$ 、50mM NaCl)中で37°C 2時間反応させた。ついで、等容のTE緩衝液飽和フェノール[TEは10mM Tris-塩酸(pH8.0)-1mM EDTA]を加え、フェノール抽出を行い、12,000rpm/5分遠心し、上層液を分取した。さらに等容の水飽和ジエチルエーテルによる処理を2回繰り返し、2容の冷エタノールおよび最終濃度0.3M CH_3COONa (pH7.0)となるよう3M CH_3COONa (pH7.0)を添加し、-20°Cで30分間放置した。12,000 rpm/5分間の遠心により沈殿を集め、さらに70%エタノールで洗浄した後沈殿を乾固し、5 μ lのTEに懸濁し

特開昭64-80294 (4)

た。

なお、以下に実施するエタノール沈殿はすべてこの方法に従った。つぎに、 Birnboim と Doly の方法 (Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513 - 1523) により大腸菌 HB101/pBR322 より調製した後 CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した 1 μ g の大腸菌クローニングベクター pBR322 に対し、10ユニットの制限酵素 Hind III を加え、同様に、20 μ l の Hind III 反応液中で 37°C 5 時間反応し、フェノール抽出、ジエチルエーテル処理、ついでエタノール沈殿による DNA 回収を行い、10 μ l の TE に懸濁した。10 μ l の Hind III 切断 pBR322 に、10 μ l の仔牛小腸アルカリホスファターゼ (4 ユニット相当、 Boehringer) を加え、最終容量 20 μ l のアルカリホスファターゼ反応液 (50 mM トリス一塩酸緩衝液 pH 9.0 、 1 mM MgCl₂ 、 0.1 mM ZnCl₂ 、 1 mM スペルミジン) 中で 37°C 1 時間反応後、フェノール抽出を 2 回行ったあと、エタノール沈殿により DNA を回収し、20 μ l の TE に懸濁した。このようにして調製したイスラエレンシス株のプラス

ロホルム処理した後、コロニーをバイオダイナフィルター（日本ポール社）に移し Henning らの方法（Analytical Biochemistry, 97, p153-157 (1979) ）に従い、コロニーの固定及びブロッキングを行った。但しブロッキングに際しては、正常ウサギ血清のかわりに牛血清アルブミン（シグマ社）を用いた。 つぎに、イスラエレンシス 401 株（オハイオ州立大 パチラス・ジェネティック、ストックセンター寄託株 Gorlitzberg ONR60A）より得られる全結晶蛋白の可溶画分を抗原としウサギに注射した後、血清から抗イスラエレンシス結晶蛋白 IgG を調製した。マレイミド法（J. Applied Biochemistry, 4, p41-57 (1982) ）により該 IgG とバーオキシダーゼを結合させた。 0.5% BSA および 50 ng/瓶のバーオキシダーゼ結合 IgG を含む PBS 級衝液（0.125M NaCl、0.02M リン酸二カリウム (pH7.2)）に処理フィルターを 4°C 緋夜浸したあと PBS 級衝液にて洗浄、風乾し、フィルターを 0.5 mg/ml の 3,3'-ジアミノベンチジンおよび 0.05% H₂O₂ を含む PBS 級衝液に浸し、発色させる

ミド由来の Hind III DNA 切断 $5\mu\text{L}$ とアルカリホスファターゼ処理した、pBR322 Hind III DNA 断片 $2\mu\text{L}$ を混合後、 $1\mu\text{L}$ の T4DNA リガーゼ（宝酒造、10ユニット）を加え、最終容積 $20\mu\text{L}$ の T4DNA リガーゼ反応液 (66mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5) 、 6.6mM MgCl_2 、 10mM DTT 、 1mM ATP) 中で、 16°C で12時間インキュベートした。反応後、リガーゼ反応液 $20\mu\text{L}$ に対し、コーエンらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, (1972) 2110-2114) により調製した $200\mu\text{L}$ のカルシウム処理大腸菌 HB101 を加え、 0°C に30分間放置した後、 42°C で60秒間熱処理した。ついで、2倍濃度の L 培地を $0.3\mu\text{L}$ 加え、 37°C で1.5時間インキュベートした。インキュベート後、 0.1mg を最終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンビシリソを含む L 平板培地 (L 培地に 1.2% の寒天を加え、固化した平板培地) にプレートし 37°C で1夜培養した。

ステップ3 エリザ法によるスクリーニング

生じたアンビシリソ耐性コロニーのうちテトラサイクリン感受性コロニーを含むプレートをクロ

ことにより、陽性コロニーのスクリーニングを行った。約1,000のアンビシリソ耐性テトラサイクリン感受性のコロニーをスクリーニングした結果、陽性クローン HB101/pBGH3が単離された。制限酵素地図を作製したところ、pBGH3は7.7Kbの *Hind* III断片を保持していた。

2. 発現プラスミドpUCH3 の構築

ステップ1 5.2 KbのHind III断片の調製

単離した陽性クローニング HB101/pBCH3からBirnboim
 とDolyの方法に従い、プラスミド DNAを調製し、
 CsCl-EBBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。
 約10 μ g のプラスミドpBCH3 DNA に対し、10ユニットの制限酵素 Hind IIIを加え、50 μ l の Hind III
 反応液中で37°C 1 時間反応させた。反応液を1 μ
 g/ml の奥化エチジウムを含む0.7%アガロースゲル
 (Agarose Type VI、シグマ社) に供し、アガロー
 ン電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で
 5.2Kb の Hind III DNA 断片に相当する部分を切り出し、
 電気溶出法によりバンドを回収し、TEに懸濁した
 のち、TE液和フェノールを加えてフェノール

特開昭64-80294 (5)

抽出を行った。12,000rpmで5分間遠心し、上層を分取した後、エタノール沈澱にて回収したDNAを20μlのTEに懸濁した。

ステップ2 大腸菌発現プラスミドpUC13の構築
BirnboimとDolyの方法に従い、大腸菌発現ベクター pUC13 DNAを調整し、CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心法により精製した。約1μgのプラスミドpUC13DNAに対し、10ユニットの制限酵素HindⅢを加え、20μlのHindⅢ反応液中で37℃ 5時間反応した後、フェノール抽出、エーテル抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10μlのTEに懸濁した。このDNA溶液を仔牛小腸アルカリホスファターゼ(4ユニット、Boehringer)、20μlのアルカリホスファターゼ反応液中で37℃ 1時間反応し、アルカリホスファターゼ処理を行った。反応後、フェノールクロロホルム処理を2回行ったのち、上澄を分取し、エタノール沈澱によりDNAを回収し20μlのTEに懸濁した。つぎにステップ1で調製したHindⅢ断片 5μlとアルカリホスファターゼ処理したHindⅢ切断 pUC13 2μlを混合

し、1μlのT4DNAリガーゼ(宝酒造、10ユニット)を加え、最終容量20μlのT4DNAリガーゼ反応液(66mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.5)、6.6mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP)中で16℃で12時間インキュベートした。得られたリガーゼ反応液20μlをハナハンらの方法(Hanahan, D. J. Mol. Biol. 166(1983)557-580)で調製した100μlの大腸菌JM109株のコンビーテントセルに加え、0℃で30分間インキュベートし、42℃で90秒間熱処理したのち、0.8mlのLブロス液体培地を加え、37℃1.5時間インキュベートし、最終濃度50μg/mlのアンピシリン、X-gal 0.004%，0.1mM IPTGを含む平板培地にプレートした。得られたアンピシリン耐性白色コロニーよりプラスミドDNAをBirnboimとDolyの方法で調製し、制限酵素HindⅢで切断後、ベクターのpUC13以外に5.2KbのHindⅢ断片を保持するクローニングを単離し、pUC13と名付けた。

3. 蚊虫蛋白遺伝子の大腸菌での発現

大腸菌組換え体 JM109/pUC13株を50μg/mlアン

ビシリン、1mMのIPTG(イソプロピル-β-D-ガラクトシド)を含む200mlのLブロス培地(1lの蒸留水に10gのトリプトン(シグマ社)、5gのイーストエキトラクト、5gのNaClおよび1gのグルコースを含む、pH7.2の培地)中で28℃終夜培養し、遠心後10mlの0.1M 2-メルカプトエタノール液に懸濁後、5~10分超音波破碎した。接着溶液に10mlの0.2Mグリシン-NaOH(pH10.5)を加え、37℃3時間インキュベートすることによりアルカリ溶解を行った。つぎに、1N塩酸にてpH7.5にせしめ、遠心した後、上澄を分取し、50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、氷中に1時間置いた後、遠心操作により、湿重約1.6gの蛋白沈澱を得た。沈澱を0.05M 2-メルカプトエタノール-0.1Mグリシン-NaOH(pH10.5)の溶液4mlに懸濁後、136mM NaCl、2.7mM KCl、81mM Na₂HPO₄、1.5mM KH₂PO₄の緩衝液に対して透析を行い、遠心上澄を分取し、固体粗抽出液とした。200μgの蛋白を12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Laemmli)の方法、Na

ture (London) 227 680-685 (1970) で分析し、さらに、Towbinらの方法(Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76 4350-54 (1979))に従い、ウェスタンプローティングを行った。用いた抗イスラエレンシス蚊虫蛋白IgGは、イスラエレンシス4Q1株から得られる全蚊虫蛋白結晶蛋白を抗原として調製されたものを用いた。その結果、分子量135~145kDaの蛋白がJM109/pUC13株において生産されていることが確認された。

各蛋白濃度の固体蛋白を含む1mlの0.1Mトリス-塩酸(pH7.4)に対して、10μlの1%ラテックスビーズ(シグマ社 0.8μm)を混合した後、室温に1時間放置し、蛋白をビーズに吸着させた。接着溶液を3mlのCulex pipiens 幼虫20頭入りの24ml蒸留水に加え、殺虫活性を測定した。その結果、コントロールに用いたJM109/pUC13株の固体蛋白液240μg/mlでは、24時間後および48時間後でも死虫は観察されなかつたが、JM109/pUC13株では30μg/ml前後で死虫が観察された。LC₅₀値を測定したところ、24時間後で39μg/ml、

特開昭64-80294 (6)

48時間後で $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。以上のことから JM109/pUCH3 株では C. pipiens に殺虫活性を有する 135 ~ 145 kDa 蛋白が生産されていることが明らかとなった。

4. イスラエレンシス殺虫蛋白遺伝子の塩基配列の決定

イスラエレンシス 135 ~ 145 kDa 殺虫蛋白遺伝子の構造を確認するため、プラスミド pBGH3 及び pUCH3 より各種、制限酵素断片を調製し、クローニングベクター M13mp18 および M13mp19 に再クローニ化した。pUCH3 より各種 M13サブクローニングについて Y. Perron らのエキソスクレアーゼ III および VII による欠失法 (Y. Perron et al. *Gene*, 33 (1985) 103-119) で各種欠失クローニングを得たのち、M13 シーケンシングキット (宝酒造) に従い塩基配列の決定を行った。即ち、得られたサブクローニングプラスミド DNA を $18 \mu\text{l}$ の TE (pH8.0) に懸濁後、 $2 \mu\text{l}$ の 2N NaOH を加え、室温で 5 分間放置し、 $8 \mu\text{l}$ の 5.0M 酢酸アンモニウムを加え、 $100 \mu\text{l}$ の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行った。

行った。ゲルを乾燥後、X 線フィルムにはさみ感光後、塩基配列を読みとった。決定した塩基配列を第 2 図に示す。本発明のバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス II0522 株の殺虫蛋白遺伝子の構造遺伝子部分は第 2 図の塩基配列の第 461 番目から第 463 番目の塩基 ATG (開始コドン) から始まり、ストップコドン TGA で終わる 3408 塩基のコーディング領域をもち、1136 個のアミノ酸をコードしていた。その結果、コードされる殺虫蛋白の分子量は 124kDa と推定される。

4. 図面の簡単な説明

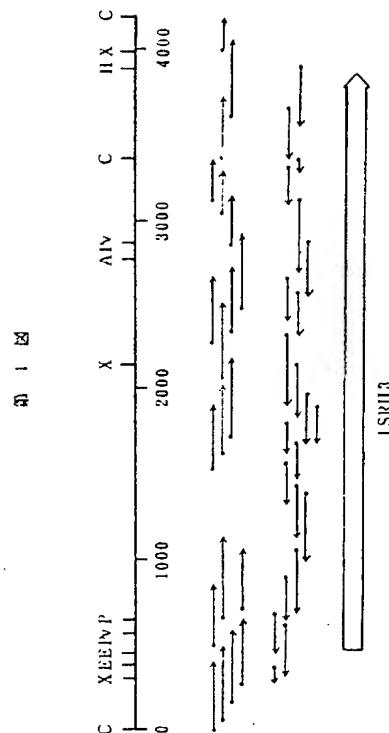
第 1 図はバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス II0522 株の 124kDa 殺虫蛋白遺伝子の制限酵素地図を示す。白い矢印は、殺虫蛋白遺伝子のコーディング領域を示す。黒い矢印は塩基配列決定の際のダイデオキシン法のストラテジーを示している。

C は Cla I, X は Xba I, E は Eco RI, Pv は Pvu II, P は Pst I, R は Hind III, ISRH3 はイスラエレンシス 124kDa 殺虫蛋白遺伝子を各々示す。

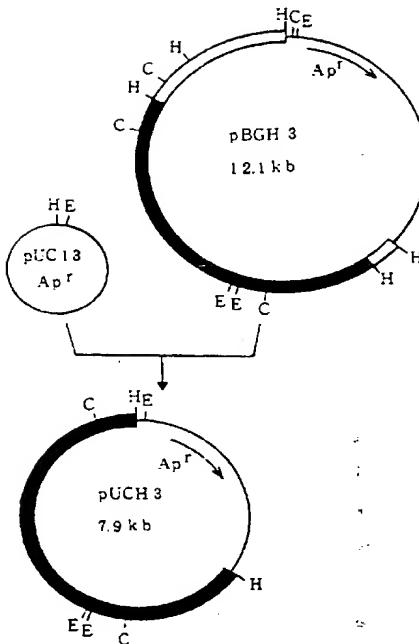
12,000 rpm で 5 分間遠心し、沈殿を回収後、70% エタノールで洗浄し、乾固し、0.5 pmole/5 μl 以上となるよう蒸留水に溶解させた。5 μl の調製したアルカリ変性プラスミド DNA またはファージ本體 DNA (5 pmol 以上) に 1.5 μl の 10 倍濃縮クレノー緩衝液 (宝酒造)、1 μl のプライマーディスク (宝酒造)、4.5 μl の蒸留水を加え、全容を 12 μl とし、60°C 15 分間加温後、常温で 20 分間放置した。この反応液に 2 μl の (α - ^{32}P) dCTP (400 Ci/mmol, アマシャム ジャパン (Amarashin, Japan)) と 1 μl のクレノー断片酵素 (宝酒造, 2 ユニット) を加え、混合した。この混合液の 3.5 μl ずつを 4 種類の 2 μl の dNTP-ddNTP 混合液 (宝酒造) に加え、39°C で 15 分間放置し、さらに 1 μl の 1 mM dNTP_s を追加し 15 分間、39°C で放置した。最後に 6 μl の 95% ホルムアミド色素 (0.1% ブロムフェノールブルーと 0.1% のキシレンシアノールを含む) を加えた。常法に従い 6% アクリルアミド-尿素ゲルを作製し、上記反応液 2 ~ 4 μl をアプライし、3,000V で 7 ~ 24 時間電気泳動を

第 2 図は 本発明のバチラス・チュリンゲンシス・イスラエレンシス II0522 株の殺虫蛋白の遺伝子の全塩基配列を示す。殺虫蛋白遺伝子の構造遺伝子部分は塩基配列の第 461 番目から第 463 番目の塩基 ATG (開始コドン) から始まり、ストップコドン TGA で終わる 3408 塩基のコーディング領域をもち、1136 個のアミノ酸をコードしている。上段は塩基配列を下段はそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

第 3 図は発現プラスミド pUCH3 の構築方法を示している。黒色のボックスが殺虫蛋白遺伝子を含む 5.2 kb の Hind III 断片を示し、白色ボックスは殺虫蛋白遺伝子に隣接する未知のクローニ化 DNA 断片を示す。実線部分はベクターを示している。Ap^r はアンピシリン耐性遺伝子を示す。



第2図



第2図(その1)

5' CGATTGAACTTCTGAATATCGAACATATATTATTTGGATGCTTGTAAACCACTAACGATATGTATGGAAAATTATTTGAAGTAAAAAAATGGTCAAATAAAATGGATAATT
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 ATATTGGTACAGAAAATATGATTGGATTAGTGAGTCTATAATATAGAAAAGGAATGTTTGTATATAAGTTGAAAGATTTCTGAAATTGTCAGAGACTGTATGTGAGAT
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 TGAGTATTGGAACATATCGTAATTTATTTAATATAATGATATGAATTACAAGGTCTAGATAAGAATTGTCATAGGAATCCGTATCAATTTCAGGAATATGTTGCA
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CTTTGGTCTTTAAATCGTAACTTAAAGATTTATCAATCTGTTACCCAGAAAAGATTGTATCCAATGTGAATATGGAGGAATAAAATATGAAATTCAAGGCTATCCGTT
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 AGCGAATGACTTACAGGCTAACGAACTATAAGATTGGCTAGCCATGTGAAAATAACCAACAGTATGGCTTAATCCAGCTGCATTAACTCTCTCAAGTACTAC
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 A N D L Q G S 4 K N T Y K D W L A N C E N N Q Q Y G V N P A A I N S S S Y S T
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 CGCTTAAAGTGGCTGAGCTATCTTAATTTGTAACCAACCTGCAAGCTACTGCTACCTGCTTACCGGCTGCTTCTCTGGCCGACTAAACTCCAGCCGCTGAAAG
 A I L K V A G A I L K F V N P P A G T V L T V L S A V L P I L W P T N T P T P E R
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 AGTTGGAAATGTTTACGACCAATACAGGAATCTTATTGCAACTGTAACAGCTATGACGAACAGATGCAAATGCAAATGACGGTTGAAAGATTATGCAATATAC
 V W N D F M T N T G N L I D Q T V T A Y V R T D A N A K M T V V K D Y L D Q Y T
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 AACTAAATTAAACACTGGAAAAGAGACGCTTAACCACTCTTAAACCACTGCAATGCAACTAACTCAATTAACTTAAACCACTGGCCAAACTTCGAGAGACCCGAGTTTATAGCAATT
 T K F N T W K R E P N N Q S Y R T A V I T Q F N L T S A K L R E T A V Y F S N L
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ACTAGGTTATGAAATTGTTATTACCAATATGGCACAAGTAGCAATTTCATTTAATAGAGATGGCTCATAAATGCAAGAATGGCTTTAGCTGGTGGTGGACCA
 V G Y E L L L L P I Y A Q V A N F N L L R D G L I N A Q E W S L A C A G D Q
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACTATATAACACTGGCAGTACACTAACGAAATATGGCATTACATGGTATAATAAGGTTAGATGACTTAAAGATAATGCAATGGACAATGGTAACTGGTAACTGGTAAAT
 L Y N T Y V Q Y T K B Y I A H S I T W Y N K G L D V L R N K S N G Q W I T F N D
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TTATAAAAGACAGATGACTTACAGTATTAGATATACTCGCTCTTGGCAGTTATGATCCACGCTGATTACCTGGCGAACAAAGATAATGCAAAACTATCAAAACAGAATTAC
 Y K R E X T I Q V D L I L F A S Y D R L A C D K I D N T K L S K T E F T
 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AAGAGAGATTACAGCTTGTAGATGAACTCTCTTCAAGTAACTAGCACTGGAGGCAAGCACTTACACGAGATGTTCACTTCACTGGCTAAAGAGAGTATTTCTGGAC
 R E I Y T A L V E S P S S K S I A A L E A I T R D V H L F T W L K R V Y F W T

特開昭64-80294 (8)

第2図(その2)

第2図(その3)

2770 1780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 S C K A A T T A A C C G T A T A C G C T T A C C T G T A C G G G A T T G T A G G A G T A G T A A G A T G T A G A C T A G G T T T C A C G C T A T G G G A A G A A A T T G C C G C A T G A T G T C A G C
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 T G A T T T A A C T A T C T C T C T A C C T T G A T T G T G A A G G G T C T A A T C G T G A G G A C T C C G C T G C C G C T A A C T T G G A A C A C T T C T G A T A T G T G T A T C A T G C C A A T A T G A
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 T A C A G G G A A A A C C A T G T C G T A T G T C A G G A T T C C A C T A T T G A T T G A T C A G G G G C A T T A G A T A C A A T G A A A A T A T G G G G T T G G C A T G T T T A A A A T C T C C
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 A G A T G G A T A C C C A T T A G A T A T T A G A G G T A T T G A A G A G G G G C A T A G T G G G A A G C A T G T C A C G C G T C A A C A C A T G G A A G A A T G C A A C G T C A A T G G A C C G
 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 T T C G G A A C A C A C A C A G C A T A T G A T G T A G G C G A A C A G G C A T T G A T G C T T A T T C A C A A T G T C A A G G T G A G G C T T A C A G T T G A T C A G C A T C T C G C T C A A T T C A G T A C C G T G A T G
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 T T T G G T A C A T C G A T T C C A T A T G T G T A C A T G A T G T G T G C A G A T G T C C C A G G T A T G A T T A T G A T A T C T G T A G A G G T T G G A T G C A C C G A T G G C C G T T A T T G T G A T A C
 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 A A G A A A T T A T T A A A A T G G T G A T T T T A C A A G G G G T A A T G G G G T G G C A T G T A C T G G G A A T G C A G A C C T A C A C A A T A G T G G T G T T T G T A T T G G T T C T A T C T A A T G G A G T G C
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 T T G C C G T A T C C A A A T G T C C A T C C A A C A T A A T C A T G G G T A T G C T T A C C G T G T T A T T G C C C A A A A A G A G G C C T G G A A T T G G G T A T G T C A C C G C T T A T G G A T T G C C G G A A T C A A G A
 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 A A A A T T G A C G C T T A C C T C T G T G A A G A A G G T A T T A C C G A A G C A G T A G A T G T A T T C C C A G A T C A G C T C G T C A G A A T T G A G A T A G G C G A A C C G A A G G T T C G T T T A T T C G G T A C A A A A G
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 C A T T G A A T T A A T T G C A T G A A C G A G T G A T T A A A A A A A T A C T A A G C T T T A A A A C C A T G G G A A G G T T C T C C A T G G T T T T A A T T C G T A C T T A A T T C G G T A C A A A A A T
 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 A T A T A G A A A A C A T A A A A A A T A G A T A T C T G A G G G A C A T A A A A T T T A C A A A T T C A A T T C A T T G A T A G A C G T T T A C C A A T A A T T A C C A T T T A A C T A C C C A A C T A C A A
 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180
 T T G T G A T C C A A C T T A T G A T G A T T A A T G A C T G A C T G A T T G A G G A T T G A A A T A G A T T T C A T C A A C A A A T G A G G G A A A G A A T A T G C A G G G A A A T C A A C A A T G C